

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: BIOPRESERVANTE DE LOS ALIMENTOS

*Tomás Agurto Sáenz¹
Juan Carlos Ramos Gorbeña¹*

RESUMEN

Las bacterias lácticas son un grupo representativo de microorganismos que tienen la capacidad de realizar transformaciones alimenticias relacionadas con las fermentaciones, además de ser capaces de sintetizar una serie de metabolitos importantes como ácido láctico y péptido de cadena corta con actividad antimicrobiana denominadas bacteriocinas, utilizadas en beneficio del hombre. Las BAL están siendo ampliamente utilizadas en la industria de los alimentos para prolongar el tiempo de durabilidad del mismo, así como también preservando y transformando las características organolépticas y calidad microbiológica del producto alimenticio debido a su acción antagonista frente a los microorganismos deterioradores de los alimentos.

Palabras claves: *Bacterias ácido lácticas; Ácido láctico; Bacteriocinas; Fermentación; Glucólisis*

SUMMARY

The lactic bacteria are a representative group of microorganisms that have the capacity to realize nutritional transformations related to the fermentations, besides being able to synthesize a series of important metabolites like lactic acid and peptide of short chain with antimicrobial activity denominated bacteriocinas, used to the benefit of the man. The BAL are widely being used in the industry of foods to prolong the time of durability of the same, as well as preserving and transforming the organoleptic characteristics and microbiological quality of the nutritional product due to their antagonistic action in front of the deterioradores microorganisms of foods.

Key words: *Lactic bacteria acid; Lactic acid; Bacteriocin; Fermentation; Glycolisis*

INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años el hombre utiliza las bacterias lácticas para la conservación de sus alimentos. Tal vez el descubrimiento de su acción sobre la leche fue probablemente accidental pero su utilización se hace permanente en la actualidad en forma de cultivos iniciadores o cepas.

Las bacterias lácticas y otros microorganismos responsables de las transformaciones alimenticias fueron desconocidos y el éxito de estas operaciones alimentarias estaba sometido a errores y aciertos.

Ya con el desarrollo de la industria, en particular la industria alimentaria, se ha llevado a la producción

de fermentos industriales con la capacidad de asegurar la calidad y estabilidad de los productos. Normalmente las bacterias que constituyen estos fermentos son especies determinadas y su actividad está bien caracterizada. Actualmente las cepas comercializadas han sido aisladas a partir de la leche o productos lácteos derivados y muy en particular de los cultivos iniciadores artesanales.

Un ejemplo claro son los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, etc. que tiene la capacidad de transformar el alimento, permitir una buena conservación de los mismos y defenderlo en

¹ Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias biológicas. Universidad Ricardo Palma.
jramos@mail.urp.edu.pe, tagurto@mail.urp.edu.pe

particular contra el deterioro de otros microorganismos.

HISTORIA DE LA FERMENTACIÓN

El procesamiento moderno de los alimentos depende de una tecnología preservativa que asegure que alimentos se encuentran mantenidos en un aceptable nivel de calidad, desde la fecha de producción hasta su posterior consumo.

Una de estas antiguas tecnologías es la fermentación, un proceso que depende solo de la actividad biológica de los microorganismos para producir una línea diversa de metabolitos que puedan suprimir el crecimiento y supervivencia de la microflora indeseable en los productos alimenticios.

La fermentación como una de las técnicas de preservación de los alimentos ha dejado huella desde hace miles de años. Considerando que el arte de fabricar queso fue desarrollado hace más de 8000 años en la fértil Crescent entre los ríos Tigres y Eufrates en Iraq, en el tiempo en que plantas y animales fueron domesticados (Fox, 1993). Después la fermentación alcohólica se involucro en la elaboración de cerveza y vino aunque el desarrollo fue durante el periodo 2000 a 4000 aC con los Egipcios y Sumarios. Los Egipcios también desarrollaron la fermentación de la masa en la elaboración del pan. Si bien las fermentaciones fueron explotadas como un método para la preservación de los alimentos y bebidas hace miles de años, estos tuvieron reconocimiento recientemente como los responsables de los procesos fermentativos.

La pasteurización desarrollada en 1861 y al principio, el papel de los microorganismos en los procesos fermentativos fue reconocida. Coincidentemente esto fue durante la revolución industrial y el resultado de la concentración de las poblaciones en las grandes ciudades. Por consiguiente un dramático cambio surgió en la producción de alimentos, se hacía necesario para las comunidades locales, la producción a gran escala de alimentos. La necesidad de expandirse a mercados más distantes demandaba la imperiosa necesidad de contar con una gran cantidad de productos alimenticios de calidad y duraderos. Esta ventaja transformó el desarrollo de los procesos fermentativos a gran escala para la producción comercial de alimentos fermentados y bebidas alcohólicas con el más variado uso de microorganismos incluyendo levaduras para la producción de vino, cerveza y alcohol, y las bacterias lácticas (LAB) para una variedad de fermentaciones de lácteos, carnes, pescados y vegetales.

En cada caso, la materia prima para los alimentos y bebidas proveía los sustratos para la formación de

una línea de metabolitos microbianos que contribuían a extender el tiempo de vida y la calidad del producto. La producción moderna a gran escala de alimentos y bebidas fermentadas depende casi enteramente del uso de cepas iniciadoras definidas que reemplazan a las tradicionales cepas mixtas indefinidas utilizadas en la elaboración de estos productos.

Este cambio de cepas pretende que el desempeño del cultivo, la calidad del producto y su consistencia y su estandarización tienen que ser los mejores.

El nexo entre la fermentación y la preservación es la biopreservación, que se refiere a extender el tiempo de vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos utilizando microorganismos y/o sus metabolitos. En este caso es sabido que los microorganismos iniciadores pueden producir una amplia línea de componentes antimicrobianos o sustancias proteínicas que puedan inhibir o reducir la flora bacteriana indeseable en los productos alimenticios.

PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS

Las bacterias lácticas tienen roles importantísimos en la producción de alimentos fermentados y algunas de estas bacterias muestran la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de una amplia variedad de microorganismos indeseables en los alimentos.

Las fermentaciones alimentarias han sido practicadas desde hace miles de años con resultados de tener una amplia variedad de alimentos fermentados derivados de la leche, carne, pescado y vegetales.

En cada caso, los procesos fermentativos involucran la oxidación de los carbohidratos para generar un grupo de productos los cuales son generalmente ácidos orgánicos, alcohol y CO₂ (Ray y Daeschel, 1992).

Tales productos tienen un efecto preservante limitando completamente el crecimiento de los microorganismos patógenos y deterioradores de los productos alimenticios. Además un número de productos ejerce un efecto sobre la calidad de los alimentos produciendo componentes que resaltan el sabor como es el caso del diacetilo y acetaldehídos, así como también componentes que tiene implicaciones positivas para la salud como es el caso de las vitaminas, antioxidantes y péptidos bioactivos (bacteriocinas). (Cuadro 1).

La acción preservante de las cepas iniciadoras en los sistemas de alimentos y bebidas es atribuida a la acción combinada de una línea de metabolitos antimicrobianos producidos durante los procesos fermentativos (Vuyst y Vandamme, 1994; Caplice y Fitzgerald, 1999).

Estos incluyen algunos ácidos orgánicos como por ejemplo el ácido láctico, acético, propiónico y ácidos

producidos como producto final que proporciona una acidificación medioambiental desfavorable para el crecimiento de algunos microorganismos patógenos y deterioradores de los alimentos.

Los ácidos ejercen su efecto antimicrobiano en interferencia con el mantenimiento del potencial de membrana celular, inhibiendo el transporte activo, reduciendo el pH intracelular e inhibiendo una variedad de funciones metabólicas (Doores, 1993). Es por eso que tienen una amplia acción inhibiendo tanto a bacterias grampositivas como gramnegativas, así como también levaduras y mohos (Blom y Mortvedt, 1991; Caplice y Fitzgerald, 1999).

Obviamente cada componente antimicrobiano producido durante la fermentación proporciona un obstáculo adicional a los microorganismos patógenos o microorganismos deterioradores de los alimentos que puedan sobrevivir o proliferar en los alimentos y bebidas, desde de la fecha de producción hasta su consumo.

Entonces algún microorganismo puede producir un número de sustancias inhibitorias, estos potenciales antimicrobianos están determinados por la acción colectiva de estos productos metabólicos sobre las bacterias indeseables. Otros metabolitos secundarios producidos por LAB que presentan actividad antagonista incluyen al compuesto Reuterin (Axelsson *et al.*, 1989; Chum *et al.* 1989, Talarico y Dobrogosz, 1989) y el descubrimiento del antibiótico Reuterocyclin (Ganzle *et al.*, 2000; Holtzel *et al.*, 2000) ambos compuestos producidos por cepas de *Lactobacillus reuteri*, tienen un amplio espectro de actividad inhibitoria sobre hongos, protozoo y una línea extensa de bacterias grampositivas y gramnegativas.

LAS BACTERIAS LÁCTICAS GENERALIDADES

Las bacterias de las fermentaciones alimentarias son grampositivas, presentan forma de cocos y/o bastoncitos, son catalasa negativas (-), sintetizan su ATP de la fermentación láctica de los glúcidos, el ácido láctico es el único producto final que producen (homofermentativos) y en otras ocasiones pueden producir etanol, CO₂ y acetato (heterofermentativos). Las bacterias lácticas son generalmente aerotolerantes, existiendo anaerobias estrictas como las que se encuentran en el intestino de los animales. Incluso en presencia de oxígeno no son capaces de llevar a cabo las fosforilaciones oxidativas, lo que está muy relacionado con su incapacidad para sintetizar citocromos y enzimas del grupo hemo. Sin embargo, gracias a las flavoproteínas, oxidasas o peroxidasas, pueden realizar limitadas oxidaciones no fosforilantes.

En 1920, Orla – Jensen, clasifico las bacterias lácticas en dos grupos según sus características bioquímicas: Las homofermentativas y las heterofermentativas.

Las bacterias heterofermentativas no tienen fructuosa-difosfato-aldolasa y por lo tanto, degradan los glúcidos por la vía denominada pentosas fosfatos o hexosas fosfatos.

La vía homofermentativa sintetizan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, mientras que por la vía heterofermentativa solo se sintetiza una molécula de ATP.

CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las interacciones establecidas entre las bacterias lácticas y los alimentos llamaron la atención de los científicos como de Louis Pasteur quien en 1857 demostró que los procesos fermentativos iban acompañados invariablemente del desarrollo de microorganismos y que cada tipo de fermentación estaba asociado a un tipo específico de microorganismo. Posteriormente, Lister, en 1873 aisló el primer cultivo puro de un microorganismos al cual denominó *Bacterium lactis*. En 1884, Hueppe describió por primera vez la microflora responsable de la acidificación y coagulación de la leche denominándola «Milchsauerbacillus», y Weigmamn en 1899 propuso el término «Bacterium acidilactici» para estos microorganismos.

A principios del siglo XX el empleo de lactobacilos en la alimentación humana cobro un enorme interés, a raíz de la propuesta realizadas por Elie Metchnikoff del Instituto Louis Pasteur de Paris de promover su utilización en la dieta como un agente bacterioprofiláctico y bacterioterapéutico (Bibel, 1988).

El habitat natural de las bacterias lácticas son los vegetales, que por un proceso de adaptación han ido colonizando otros sustratos que reúnen las condiciones necesarias para su desarrollo. Algunas bacterias lácticas bien en asociación con los vegetales y desarrollan a expensas de los nutrientes liberados tras la muerte y descomposición de los tejidos vegetales, también se encuentran en los encurtidos, la col ácida, el pienso, los productos de panadería, la cerveza, el vino y los zumos de frutas. Otro nicho ecológico es la leche a la que llegan a través del cuerpo de la vaca, el estiércol y los vegetales, por eso que se encuentran íntimamente relacionados con diversos productos lácteos fermentados. Otro grupo de bacterias lácticas se encuentra formando parte de la flora bacteriana normal del cuerpo del animal y también en el tracto gastrointestinal y mucosas, por lo que se encuentra asociado a la carne y productos

cárnicos. Finalmente algunas otras bacterias lácticas han sido aisladas a partir del pescado, del estiércol y aguas residuales.

En la edición de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986), las bacterias grampositivas, de forma cocoide o bacilar, no esporuladas, anaerobias facultativas, catalasa negativa y productoras de ácido láctico tras la fermentación de la glucosa se clasificaron en los géneros:

- *Lactobacillus*
- *Erysipelotrich*
- *Streptococcus*
- *Pediococcus*
- *Leuconostoc*
- *Aerococcus*
- *Gemella*.

GÉNERO LACTOBACILLUS

El género *Lactobacillus* (Kandler y Weiss, 1986) incluían 45 especies dividida en tres grupos dependiendo de la presencia o ausencia de la fructosa 1,6-difosfato aldolasa y fosfoacetolasa, enzimas claves del proceso homofermentativos y heterofermentativo de los carbohidratos respectivamente.

Los *Lactobacillus* se caracterizan por ser células en forma de bastoncillos agrupadas en cadena, presentan una exigencia de nutrientes en los factores de crecimiento, una acidificación de la leche más lenta que en el caso de los estreptococos pero generalmente más intensa gracias a una mejor resistencia a los pHs ácidos (hasta pH 3.5) y a una producción más elevada de ácido láctico con un máximo de 27 g/litro.

Las especies del género *Lactobacillus* se caracterizan por la heterogeneidad de la composición de su ADN, el porcentaje (%) de su GC varía del 32 al 53% (Kandler y Weiss, 1986^a).

Este género clasificado originalmente por Orla – Jensen en 1919 en tres grupos:

1. Thermobacterium: homofermentativos y termófilos
2. Streptobacterium: homofermentativos y mesófilos
3. Betabacterium: heterofermentativo, ya sea mesófilo o termófilo

Los resultados de la taxonomía molecular, la determinación del tipo de PTG (peptidoglicano), las propiedades de ciertas enzimas como la LDH (lactato deshidrogenasa), la determinación del isómero del ácido láctico (Botazzi, 1988), el crecimiento del genoma y la hibridación ADN-ADN (Sriranganathan et al., 1985), han permitido (Kandler y Weiss 1986b) dividir a los *Lactobacillus* en tres grupos que cubre, bajo nuevas definiciones, los grupos de Orla – Jensen (Cuadro 2).

1. Grupo I: *Lactobacillus* homofermentativos obligatorios, que incluyen a las especies del grupo Thermobacterium y otras especies nuevas descritas. Son incapaces de fermentar las pentosas y el gluconato (Kandler y Weiss, 1986b).

Sus células son alargadas, rectas y a menudo en empalizada (Botazzi, 1988). Presenta dos conjuntos de especies centrados principalmente en *Lb. delbrueckii* y *Lb. acidophilus*. Las subespecies de *Lb. delbrueckii* poseen una homología de su ADN en más del 80% (Weiss et al., 1983). *Lb. delbrueckii*

subsp. delbrueckii, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. delbrueckii subsp. leichmanii*. Estas bacterias producen hasta 18 g/litro de ácido láctico D (-).

Las especies de *Lb. acidophilus* es por el contrario muy heterogéneo, está formado por tres subgrupos caracterizados cada uno de ellos por las siguientes especies. *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. gasserii*. *Lb. helveticus* es considerada como una derivada de *Lb. acidophilus* por adaptación al lactosuero ácido, se caracteriza por ser el productor más grande de ácido láctico DL entre los *Lactobacillus* 27 g/litro (Kandler y Weiss, 1986b).

2. Grupo II: *Lactobacillus* homofermentativos facultativos, formado por el grupo Streptobacterium y especies nuevas. La fermentación de las hexosas es homofermentativa, la de las pentosas y el gluconato es heterofermentativa con producción de ácido láctico y acético (Kandler y Weiss, 1986b).

Sus células son cortas, a menudo ordenadas en filamentos (Botazzi, 1988). Grupo muy heterogéneo formado por tres conjuntos de especies centradas en *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, y el grupo de *Lb. sake* – *Lb. curvatus* – *Lb. bavaricus*. Se caracterizan por producir poco ácido láctico entre 3 a 13 g/litro de la forma L (+) o DL según la especie. *Lb. plantarum* es una especie gigante formada por cepas de homología variable con la cepa tipo.

El conjunto de *Lb. casei* contiene tres genotipos: la cepa tipo, un grupo de tres sub-especies *Lb. casei subsp. casei*, *Lb. casei subsp. pseudoplantarum* y *Lb. casei subsp. tolerans* y el tercer grupo constituido por *Lb. casei subsp. rhamnosus*.

3. Grupo III: *Lactobacillus* heterofermentativos obligatorios, se incluyen a los del grupo Betabacterium. Como producto de la fermentación de las hexosas se obtiene ácido láctico, acético, (o etanol) y CO₂ en una relación 1:1:1; la de las pentosas, ácido láctico y acético (Kandler y Weiss, 1986b).

Sus células son cortas, rectas y separadas (Botazzi, 1988). Incluyen especies muy diversas que poseen, a pesar de tener a veces un % de GC muy cercano, poca homología entre ellas, su producción de ácido es débil, 5 g/litro, y el ácido láctico producido es de la forma DL.

Las especies más destacables son *Lb. sóme*, *Lb. buchneri* y *Lb. reuteri*; *Lb. fermentum*; *Lb. brevis*; *Lb. bifementans*, capaz de producir hidrógeno gracias a una formiato hidrogeno liasa.

GÉNERO *ERYSIPELOTHRIX*

El género *Erysipelothrix* (Jones, 1986) era mono específico.

GÉNERO *ESTREPTOCOCCUS*

El género *Streptococcus* (Hardie, 1986; Mundt, 1986) engloba a un total de 30 especies distribuidas en 6 grupos: estreptococos piógenos, estreptococos orales, estreptococos anaeróbicos, estreptococos lácticos, otros estreptococos y enterococos.

GÉNERO *PEDIOCOCCUS* y *LEUCONOSTOC*

El género *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Garvier, 1986) comprendían un total de 8 y 4 especies respectivamente.

GÉNERO *AEROCOCCUS*

El género *Aerococcus* (Evans, 1986) era mono específico.

GÉNERO *GEMELLA*

El género *Gemella* (Reyn, 1986) era mono específico.

Pero con los últimos avances en el desarrollo y la utilización de técnicas bioquímicas y moleculares como la determinación de la composición de las bases nitrogenadas adenina y guanina del ADN (mol%GC), la hibridación química de los ácidos nucleicos (ADN:ADN – ADN:ARN) y su secuenciación han producido cambios en la taxonomía de las bacterias lácticas, la mayoría de los cuales aparecen en la 9^{na} edición del «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (Holt et al., 1994).

Refiriéndonos a la secuenciación de ARNr 16s y ha estudios de hibridación ADN:ARNr (Garvier y Farrow, 1981; Kilpper – Balz y Schleifer, 1981; Schleifer et.al, 1985) el género *Streptococcus* se ha dividido en tres grupos filogenéticamente distintos:

- *Streptococcus sensu strictos*
- *Enterococcus*
- *Lactococcus*

El género *Streptococcus sensu strictos* comprende a la mayoría de *Streptococcus* incluidos en la última edición de «Bergey's Manual» (1986) en los grupos piógenos, orales y «otros» estreptococos, así como a las diversas especies de identificación reciente y quedan excluidos del género los *Streptococcus* anaeróbicos (Schleifer y Kilpper – Balz, 1987). De los *Streptococcus* la especie útil en la industria de los alimentos es *Streptococcus thermophilus* que junto a *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus*, se utilizan para la elaboración del yogurt y algunas variedades de queso.

El género *Lactococcus* (Schleifer et.al, 1985) alberga a los *Streptococcus* lácticos o del grupo N de Lancefield (Jones, 1978), representada por *Lactococcus lactis subespecie lactis*, ahora *Lactococcus lactis* (incluye a las especies anteriormente denominadas *S. lactis subespecie lactis*, *S. lactis subespecie diacetylactis* y *Lb. Xilosus*) y *Lactococcus lactis subespecie cremoris* ahora *Lactococcus cremoris*. Además están presentes *Lactococcus lactis subespecie hordniae* (anteriormente *Lb. hordniae*) ahora denominada *Lactococcus hordniae*; a *Lactococcus raffinolactis* (anteriormente *S. raffinolactis*), *Lactococcus garviae*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus piscium* de reciente identificación (Williams et. Al, 1990).

El género *Enterococcus* se encuentra formado por los anteriormente denominados *Streptococcus fecalis* o del grupo D de Lancefield (Jone, 1987) con excepción de *Streptococcus bovis* y *Streptococcus equinus* junto a otras especies de reciente identificación.

Cabe señalar que los *Streptococcus* del grupo N de Lancefield, incluidas previamente en el género *Lactococcus*, has pasado a formar parte del género *Vagococcus* con la especie *Vagococcus fluviales* como cepa tipo (Collins et. al 1989^a). Posteriormente algunos lactobacilos atípicos aislados del salmón se han identificado como *Vagococcus salmoninarum* (Walbanks et.al, 1990).

Respecto al género *Lactobacillus*, las especies *Lb. piscícola*, *Lb. divergens* y *Lb. carnis*, anteriormente clasificadas en el grupo III, han pasado a constituir el género *Carnobacterium*, que actualmente comprende también las nuevas especies *Carnobacterium gallinarum*, *C. mobile*, *C.*

funditum, *C. alterfunditum* (Collins et al., 1987^a; Walbanks et al., 1990), Collins et al., 1991 sugiere el nombre *C. maltaromicus* (antiguamente *Lb. maltaromicus*) como sinónimo de *C. piscícola*.

En relación al **género *Pediococcus***, la especie *P. urinaeequi* se ha transferido al género *Aerococcus* (*A. urinaeequi*) y la especie *P. halophilus* ha pasado a constituir el nuevo género denominado *Tetragenococcus* (*T. halophilus*), de este modo el género *Pediococcus* queda finalmente constituido por los siguientes géneros: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. dextranicus*, *P. inopinatus* y *P. parvulus*.

Finalmente, el **género *Leuconostoc*** esta constituido por 4 especies que se incluyen en la última edición del «Bergey's Manual of Systematic bacteriology» (1986) (*Lc. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lc. paramesenteroide* y *Lc. oenos*) y por 6 especies de reciente identificación: *Lc. gelidum*, *Lc. carnosus*, *Lc. amelobiosum*, *Lc. citreum*, *Lc. pseudomesenteroides* y *Lc. fallax* (Martínez – Murcia et al., 1991^a; Pot et al., 1994b).

Considerando como características finales de las bacterias lácticas su carácter Grampositivo, no esporulados, microaerofilos o anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos y su capacidad de producir ácido láctico como producto final y mayoritario derivado de la fermentación de los azúcares y su estrecha relación con los alimentos se consideran que el grupo de las bacterias lácticas está constituido por los siguientes géneros:

- ***Lactobacillus***
- ***Carnobacterium***
- ***Streptococcus***
- ***Lactococcus***
- ***Vagococcus***
- ***Enterococcus***
- ***Leuconostoc***
- ***Pediococcus***
- ***Tetragenococcus***

Respecto al metabolismo de los carbohidratos las bacterias lácticas se agrupan en tres categorías (Axelsson, 1993) que son:

- **Homofermentativas obligadas**
- **Heterofermentativas obligadas**
- **Heterofermentativas facultativas**

Las bacterias lácticas **homofermentativas obligadas** (*Lactobacillus* del grupo I) oxidan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico a través de vía fermentativa Embden-Meyerhof-Parnas, mediante la participación de la enzima denominada

fructosa 1,6-difosfato aldolasa. Estas bacterias carecen de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenada y 6-fosfogluconato deshidrogenasa debido a ello no son capaces de fermentar las pentosas ni el gluconato (Cuadro 3).

Las bacterias lácticas **heterofermentativas obligadas** (*Leuconostoc* y *Lactobacillus* del grupo III) degradan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético o etanol y las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético, a través de la ruta metabólica de las pentosas fosfato con la participación de la enzima fosfocetolasa. Estas bacterias lácticas carecen de la enzima fructosa 1,6-difosfato aldolasa.

El resto de las bacterias lácticas (*Lactobacillus* del grupo II, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*) fermentan las hexosas casi exclusivamente hasta ácido láctico por la vía Embden –Meyerhoff – Parnas (igual que las bacterias lácticas homofermentativas obligadas), pero algunos microorganismos a pesar de no presentar la enzima fosfocetolasa, en condiciones limitantes de carbohidratos y anaerobiosis producen además ácido fórmico, ácido acético y etanol (Cogan et al., 1989). En lo que respecta la utilización de las pentosas, la mayoría de estos microorganismos son capaces de fermentarla por la acción de la fosfocetolasa inducible, produciendo cantidades equivalentes de ácido láctico y ácido acético (Kandler, 1983).

De otro lado las bacterias lácticas también pueden utilizar a los disacáridos como la lactosa y sacarosa. Estos disacáridos ingresan a la célula mediante un sistema de permeasa dependiente del ATP o del sistema fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato (Sistema PEP – PTS) y son desdoblados hasta sus monosacáridos correspondiente los cuales son utilizados mediante el proceso fermentativo para producir ácido láctico y otros metabolitos (Kandler, 1983).

EL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por Scheele como causante de la acidificación y consiguiente cortado de la leche. No fue sino hasta mediados del siglo XIX que Pauster demostró que el ácido láctico es producido por microorganismos presentes en la leche.

La elaboración del ácido láctico en 1880 fue la primera producción de un ácido orgánico de origen microbiano. (Crueger y Crueger, 1984).

El ácido láctico es el resultado final del metabolismo anaeróbico, principalmente de ciertas bacterias denominadas **bacterias lácticas (LAB)**. El ácido láctico es utilizado en una amplia variedad de productos como alimentos fermentados y bebidas.

El uso de compuestos acidificantes en la conservación y mejora de las propiedades organolépticas en los alimentos es extensa. Estos ácidos genéricamente denominados ácidos orgánicos, son intermediarios o productos finales de ciclos metabólicos básicos lo cual ocurre en una gran variedad de organismos vivos. Tales compuestos incluyen a los ácidos: cítrico, málico, láctico, acético y fumárico.

La incorporación de ácidos o sus sales en los alimentos cumple diversas funciones dentro de las cuales cabe destacar el gran poder acidificante, la capacidad amortiguadora o reguladora del pH, emulsificante, y sus efectos organolépticos.

El principal uso es su capacidad de acidificación y control del pH en el producto final; un pH bajo retarda y/o elimina el crecimiento de microorganismos indeseables en los productos alimenticios. Asimismo reduce la necesidad de tratamientos térmicos drásticos durante la esterilización por ejemplo de frutas y verduras enlatadas.

BIOQUÍMICA DEL ÁCIDO LÁCTICO

Todas las LAB son sacarolíticas y deficientes en malas rutas biosintéticas. En consecuencia presentan requerimientos nutricionales complejos que obligan a restringirse a medios altamente ricos en nutrientes como por ejemplo el tracto intestinal y la leche.

Estas bacterias son anaeróbicas pero esencialmente aerotolerantes. Existen dos rutas metabólicas de degradación de carbohidratos hasta ácido láctico.

1. Ruta homofermentativa, es la que genera ácido láctico como único producto al final de la degradación de los carbohidratos, con un rendimiento neto de dos moles de ácido láctico por un mol de glucosa, y es por consiguiente, la de interés en la producción.

2. Ruta heterofermentativa, es la que genera la producción de etanol y CO₂ en cantidades equimolares al ácido láctico sintetizado.

GLUCÓLISIS

La glucólisis o fermentación es una reacción de oxidoreducción interna equilibrada en la que algunos átomos de la fuente de energía se reduce mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación del sustrato.

La glucólisis es una vía fermentativa denominada también **Vía Embden-Meyerhof-Parnas**. Esta se divide en tres etapas principales donde se produce una serie de reacciones individuales catalizadas enzimáticamente.

ETAPAS I Y II: REACCIONES PRELIMINARES Y REACCIONES REDOX

Durante la Etapa I, la glucosa se fosforiliza mediante la molécula de ATP formando a la glucosa-6-fosfato, que luego será convertida en un isómero, la fructosa-6-fosfato, que mediante una segunda fosforilación es convertida a fructosa-1,6-difosfato, que es el metabolito intermediario clave en el proceso de la glucólisis. La enzima aldolasa cataliza la ruptura de la fructosa-1,6-difosfato en dos moléculas de tres carbonos denominadas gliceraldehído-3-fosfato y su isómero dihidroxiacetonafofosfato. Durante esta etapa no ha ocurrido ninguna reacción redox, el consumo de ATP tiene lugar sin la transferencia de electrones. Recién en la segunda etapa se produce la primera reacción redox durante la conversión del gliceraldehído-3-fosfato en ácido 1,3-difosfoglicérico, que ocurre dos veces por cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato, una enzima cuya coenzima es NAD⁺ acepta dos átomos de hidrógeno y el NAD⁺ se convierte en NADH; esta transformación es catalizada por una enzima denominada gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Simultáneamente, cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato es fosforilizada por adición de una molécula de fosfato inorgánico. Esta reacción, en la que el fosfato inorgánico se convierte en orgánico, prepara el escenario para la conversión de la energía por fosforilación a nivel del sustrato, la formación del ATP es posible porque cada uno de los fosfatos de la molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico presenta un enlace de alta energía. La síntesis del ATP tiene lugar cuando cada molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico se convierte en ácido 1,3-difosfoglicérico y cuando más tarde en la vía metabólica, cada molécula de fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato.

ETAPA III: PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

Durante la formación de dos moléculas de ácido 1,3-difosfoglicérico, se reducen dos moléculas de NAD⁺ a NADH. Sin embargo, las células contienen solo una pequeña cantidad de NAD⁺, y si todo se convirtiera en NADH se detendría la oxidación de la glucosa. La oxidación continua del gliceraldehído-3-fosfato solo puede proseguir si está presente una

molécula de NAD⁺ para aceptar los electrones liberados. Este «bloqueo» se supera en la fermentación mediante la nueva oxidación de NADH a NAD⁺, a través de reacciones que supone la reducción del piruvato a una extensa variedad de productos de fermentación. En el caso de las levaduras, el piruvato se reduce a etanol y se libera CO₂. en las bacterias ácido lácticas (LAB) el piruvato se reduce a lactato.

Durante cualquier proceso que produzca energía, la oxidación debe acompañarse de una reducción y debe haber un aceptor de electrones por cada electrón cedido. En este caso, la reducción del NAD⁺ en un paso enzimático de la glucólisis se equilibra con su oxidación en el otro paso. Los productos finales también deben estar en equilibrio redox con el sustrato inicial, la glucosa. Es así que los productos finales que se generan etanol más CO₂ o lactato más protones, estén en equilibrio atómico y electrónico con la glucosa inicial.

La glucólisis consume dos moléculas de ATP durante las dos fosforilaciones de la glucosa y se sintetizan cuatro moléculas de ATP, dos por cada molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico convertida a piruvato, por tanto, la ganancia neta del organismo es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada.

LITERATURA CITADA

- ALOKOMI, H., Skytta, E. Saarela, T., Latva-Kala, K. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2001-2005.
- BELL, M.F., Marshall, R.T. & Anderson, A.E. 1986. Microbiological and sensory tests of beef treated with acetic acid and formic acids. *Journal of Food Protection*. 49: 207-210.
- BERRY, Elaine and Cutter, C.N. 2000. Effects of acid adaptation of *E. coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1493-1498.
- DATTA, Rathin, Tsai, S.P., Bonsignore, P. 1995. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews*. 16: 221-231.
- DUBAL, Z.B, Paturkar, A.M, Waskar, V.S. 2004. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. Aureus*, *L. Monocytogenes*, *E. Coli*, and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science*. 66: 817-821.
- DUMIER, F., Colligman, A. 2003. The effects of sodium lactate and starter cultures on pH lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* levels in pure chicken dry fermented sausage. *Meat Science*. 65: 1165-1174.
- DYKES, G.S, Marshall, Meissener, D. and VonHoly, A. 1996. Acid treatment and pasteurization affect the shelf life and spoilage ecology of vacuum packaged Vienna sausages. *Food Microbiology*. 13: 64-74.
- JACK, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram – positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59: 171-200.
- LEVEAU, J.; Bouix, M., 2000. Microbiología Industrial (Los microorganismos de interés industrial). Editorial Acribia, S.A. España.
- MADIGAN, Michael T., Martinko, Jhon M., Parker, Jack. 2004. Brock, Microbiología de los microorganismos. Décima edición. Editorial Pearson Prentice Hall.
- MEDYNISKI, A., Pospiech, E., Kniat, R. 2000. Effect of various concentrations of lactic acid and sodium chloride on selected physico-chemical meat traits. *Meat Science*. 55: 285-290.
- PRESCOTT, Harley. Klen. 2002. Microbiología. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill.
- ROSS, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 79: 3-16.
- SAMELIS, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A. and Smith, G. 2001. Influence of the natural microbial flora on the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in model system of fresh meat decontamination fluids. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2410-2420.
- SCHEPERS, Adolf, Thibault, Jules, Lacroix, Christophe. 2002. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH – controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Parte I multiples factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 176-186.

STILES, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.

TIENUNGOON, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. and Ross, T. 2000. Growth limits of *L. monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4979-4987.

CAPLICE Elizabeht, Gerald F. Fitzgerald. 1999. Food Fermentations: Role of microorganisms in food

production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 131-149.

MILNER J. 1999. Functional foods and health promotion. *J Nutr*; 129: 1395-1397.

PIETRO A, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins K, Paglienari M, Caderni G. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*; 23: 1953-1960.

Cuadro 1
Biopreservación por Bacterias Lácticas (LAB)

Producto	Microorganismo	Substrato
Vino - cerveza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LAB	Uva, cereales, lúpulo
Pan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LAB	Cereales, arroz, trigo
Queso cheddar	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> y <i>Leuconostoc</i>	Leche
Queso tipo suizo	<i>Lactobacillus (delbruckii, bulgaricus, helveticus)</i>	Leche
Yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lb. bulgaricus</i>	Leche
Carnes fermentadas	<i>Pediococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , varios LAB	Cerdo, res
Vegetales	<i>Enterococcus (mundtii, faecium)</i> <i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> <i>Lactobacillus (plantarum, casei)</i>	Vegetales
Pescado	<i>Carnobacterium (piscicola, divergens)</i>	Peces

Fuente: Caplice y Fitzgerald (1999) y Cleveland *et al.* (2001)

Cuadro 2

CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS BASADOS EN LOS CRITERIOS DE ORLA-JENSEN (1919) Y SU CORRESPONDIENTE CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL				
Género ^a	Morfología	Reacción catalasa	Fermentación de la glucosa	Género actual
<i>Betabacterium</i>	Bacilar	Negativa	Heterofermentativa	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Bacilar	Negativa	Homofermentativa	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Bacilar	Negativa	Homofermentativa	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Cocoide	Negativa	Homofermentativa	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i> <i>Enterococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Cocoide	Negativa	Heterofermentativa	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	Bacilar	Positiva	Homofermentativa	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Cocoide	Positiva ^b	Homofermentativa	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

a Denominación genérica atendiendo a los criterios de Orla-Jensen(1919)

b Los *Pediococcus* son generalmente catalasa negativos, pero algunas especies producen pseudocatalasa.

Fuente: Stiles y Holzapfel (1997).

Cuadro 3

Principales especies incluidas tradicionalmente en los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* atendiendo a sus relaciones filogenéticas y tipo de metabolismo fermentativo

Grupos filogenéticos	Grupos según el Metabolismo de los carbohidratos		
	I. Homofermentativos obligados	II. Heterofermentativos facultativos	III. heterofermentativos obligados
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. amylophilus</i> , <i>Lb. amyloborus</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> <i>subesp. delbrueckii</i> <i>subesp. lactis</i> <i>subesp. bulgaricus</i> <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasserii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. kefiranofaciens</i> <i>Lb. kefirgranum</i>	<i>Lb. acetotolerans</i> <i>Lb. hamsteri</i>	
<i>Lb. casei</i> – <i>Pediococcus</i>	<i>Lb. aviarus</i> <i>subesp. araffinosus</i> <i>subesp. aviarus</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. mali</i> <i>Lb. ruminis</i> <i>Lb. salivarius</i> <i>subesp. salicinus</i> <i>subesp. salivarius</i> <i>Lb. sharpae</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. parvulus</i>	<i>Lb. agilis</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. bifementans</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>subesp. coryniformis</i> <i>subesp. torquens</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. graminis</i> <i>Lb. homolochii</i> <i>Lb. intestinalis</i> <i>Lb. murinus</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Subesp. paracasei</i> <i>Subesp. tolerans</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sake (Lb. bavaricus)</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. vaginalis</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. oris</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. kéfir</i> <i>Lb. malefermentans</i> <i>Lb. parabuchnerii</i> <i>Lb. panis</i> <i>Lb. parakefir</i> <i>Lb. pontis</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. suebicus</i> <i>Lb. vaccinoferus</i>
<i>Leuconostoc</i>			<i>Lc. mesenteroides</i> <i>Lc. pseudomesenteroides</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. citreum</i> <i>Lc. gelidum</i> <i>Lc. carnosum</i> <i>Lc. fructosus (Lb. fructosus)</i> <i>Lc. argentinum</i> <i>Lc. fallax</i> <i>W. paramesenteroides (Lc. paramesenteroides)</i> <i>W. confusus (Lb. confusus)</i> <i>W. holotolerans (Lb. holotolerans)</i> <i>W. kandleri (Lb. kandleri)</i> <i>W. minor (Lb. minor)</i> <i>W. viridescens (Lb. viridescens)</i> <i>W. hellenica</i> <i>O. oeni (Lc. oenus)</i>
Otros lactobacilos ^a	<i>Lb. divergens (C. divergens)</i> , <i>Lb. carnis (C. carnis)</i> , <i>Lb. piscicola</i> y <i>Lb. maltaromicus (C. piscicola)</i> , <i>Lb. hordniae</i> y <i>Lb. xylosus (L. lactis)</i>		

^a Las especies de este grupo se han excluidos del genero *Lactobacillus*.
Fuente: Vandamme et al. (1996) y Stiles y Holzapfel (1997).